

制限増殖型アデノウイルスは保存されたE1A領域により腫瘍血管新生を抑制する

著者	齋藤 雄康
号	1952
発行年	2003
URL	http://hdl.handle.net/10097/22444

氏 名（本籍）	さい 齋	とう 藤	ゆう 雄	こう 康
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 9 5 2 号			
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻			
学 位 論 文 題 目	Oncolytic replication-competent adenovims suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region （制限増殖型アデノウイルスは保存された E1A 領域により腫瘍血管新生を抑制する）			
論文審査委員	（主 査） 教授 松 野 正 紀 教授 下瀬川 徹 教授 佐 藤 靖 史			

論文内容要旨

膵癌は非常に予後が悪く、いまだに既存治療では予後の改善は期待できない。その悪性度は多彩な遺伝子異常によるところが大きく、膵癌においては K-ras (80%以上), *TP 53* (50~70%), *TP 16* (80%以上), *SMAD 4* (約 55%) が報告されている。そのため、遺伝子異常を標的とした治療戦略が確立されれば非常に有効な治療になる可能性が高い。遺伝子異常を標的とした治療法はすでにいくつか報告されているが、最近制限増殖型アデノウイルスを用いた治療が期待され、注目されている。当教室においても元井らが、制限増殖型アデノウイルスと IL-12 の併用療法、大沼らが Uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) 遺伝子組み込み制限増殖型アデノウイルスと 5FU の併用療法でその有効性を示し、現在も臨床応用すべく研究中である。

一方、膵癌を含む固形癌において血管新生が増殖、浸潤、転移に重要な役割を果たしており、vascular endothelial growth factor (VEGF) を含む様々な血管新生因子が腫瘍内で発現増強していることが報告されている。VEGF は低酸素刺激により発現してくる hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) により転写が活性化されるため、HIF-1 α の分解に関与する von-Hippel-Lindau (VHL) 蛋白、ユビキチン・プロテアソーム系などが血管新生抑制治療の標的として最近注目されている。制限増殖型アデノウイルスは癌細胞内で特異的に増殖し、細胞を破壊するが、感染に伴い発現する early region 1A (E1A) 蛋白は血管新生抑制作用を有することが報告されている。すなわち感染細胞の破壊以前に発現する E1A による血管新生抑制が腫瘍増殖抑制において重要な役割を果たす可能性が示唆される。今回我々は様々な E1A を発現するアデノウイルスベクターを用いて E1A の腫瘍血管新生に及ぼす影響を検討した。併せて p300 などとの関連についても解析した。

まず膵癌細胞 4 株 (AsPC-1, Panc-1, PK-1, PK-8) に対し野生型 E1A をもつ制限増殖型アデノウイルスベクター (AxE1AdB), コントロールウイルス (no E1A, AxCA-lacZ) を感染させ、ウイルス感染、低酸素負荷時の VEGF 濃度の測定 (ELISA 法), VEGF m-RNA の発現 (RT-PCR 法) を検討した。4 株とも AxCA-lacZ 感染細胞では低酸素刺激において VEGF の発現増強を認めたが、AxE1AdB 感染細胞では未刺激時と同等までの発現抑制を認め、これは m-RNA レベルによるものであった。次に AsPC-1 に様々な E1A を持つアデノウイルスベクターを感染させ同様の検討を行ったが、p300 結合部位に部分的に変異のある E1A を持つアデノウイルスベクター (AxdA (2-17) dB, dl 1101) では低酸素刺激においてタンパク、m-RNA レベルとも VEGF の発現低下は軽度であった。E1A, p300 による免疫沈降実験では、AxdA (2-17) dB, dl 1101 感染細胞において p300 との結合が低下し、AxE1AdB 感染細胞での低酸素時の VEGF 発現低下には E1A, p300 の結合の関与が示唆された。次に膵癌細胞 4 株での

HIF-1 α の発現を検討した。HIF-1 α はこれまでは通常状態では VHL 蛋白, ユビキチン・プロテアソーム系の働きで分解され検出できないと言われてきたが, 最近の報告では膀胱癌を含むいくつかの癌細胞において通常状態でも HIF-1 α の発現が報告されている。本研究においても4株全てで通常状態での HIF-1 α の発現が確認され, 低酸素刺激により発現増強が認められた。特に VEGF が強く発現していた PK-8 では通常状態, 低酸素状態とも高発現しており, HIF-1 α と VEGF の発現の関与が示唆された。AsPC-1 に VEGF の検討同様5種のアデノウイルスベクターを感染させ, HIF-1 α 発現の検討を行った。m-RNA レベルでの発現は同様であったが, Western blot において E1A の p300 結合部位に部分的に変異のある AxDA (2-17) dB, dl 1101 に比べ野生型 E1A である AxE1AdB において低酸素刺激時の増強抑制効果が認められ, E1A が関与している可能性が示唆され, 今後さらなる検討が必要と思われた。

さらに, SCID mice での AxCA-lacZ, AxE1AdB, dl 1101 感染細胞の皮下腫瘍モデルを用い, *in vivo*での腫瘍血管新生の検討を行った。AxCA-lacZ に比べ, AxE1AdB, dl 1101 で同様のウイルス増殖, 腫瘍細胞死を認めたが, AxE1AdB では腫瘍への新生血管及び皮下腫瘍内の血管密度とも抑制され, *in vivo*でも E1A, p300 の結合の並びに低酸素時の E1A による HIF-1 α の増強抑制が血管新生抑制に関与している可能性が示唆された。

これらより野生型 E1A を発現する制限増殖型アデノウイルスはウイルスによる腫瘍増殖抑制効果に加えて, 腫瘍血管新生抑制効果も期待できる可能性が示唆され, 非常に有望な治療と考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

肺癌は非常に予後が悪く既存治療で予後の改善は期待できない。多彩な遺伝子異常がその悪性に寄与しており、制限増殖型アデノウイルスを用いた治療が注目されている。また血管新生が増殖、浸潤、転移に重要な役割を果たしており、vascular endothelial growth factor (VEGF) を含む様々な血管新生因子が腫瘍内で発現増強している。VEGF は低酸素時に発現する hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) により転写が活性化され、HIF-1 α は血管新生抑制治療の標的として注目されている。アデノウイルス感染で発現する early region 1A (E1A) 蛋白は血管新生抑制作用があり、今回様々な E1A を発現するアデノウイルスベクターを用い E1A の腫瘍血管新生に及ぼす影響、p300 との関連について解析した。

肺癌細胞 4 株 (AsPC-1, Panc-1, PK-1, PK-8) に野生型 E1A をもつウイルスベクター (AxE1AdB), コントロールウイルスベクター (no E1A, AxCA-lacZ) を感染させ、ウイルス感染、低酸素負荷時の VEGF 蛋白, m-RNA の発現を検討した。4 株全てで蛋白, m-RNA レベルとも AxCA-lacZ 感染細胞で低酸素時に発現増強し, AxE1AdB 感染細胞で未刺激時と同等の発現抑制を認めた。AsPC-1 に様々な E1A を持つウイルスベクターを感染させ同様の検討を行ったが, p300 結合部位に部分的に変異のある E1A を持つウイルスベクター (AxdA (2-17) dB, dl 1101) では低酸素時の蛋白, m-RNA レベルとも VEGF の発現低下は軽度だった。E1A, p300 による免疫沈降実験では, AxdA (2-17) dB, dl 1101 感染細胞で p300 との結合が低下し, AxE1AdB 感染細胞での低酸素時の VEGF 発現低下には E1A, p300 の結合の関与が示唆された。

HIF-1 α は 4 株全てで通常状態で発現し低酸素状態で増強した。VEGF の検討同様ウイルス感染細胞で HIF-1 α 発現の検討を行った。m-RNA レベルの発現は同様だったが, 蛋白レベルで AxdA (2-17) dB, dl 1101 に比べ AxE1AdB で低酸素刺激時の増強抑制効果が認められ, E1A の関与が示唆された。

in vivo で腫瘍血管新生の検討を行ったが, *in vitro* 同様であった。

これらより野生型 E1A を発現する制限増殖型アデノウイルスは, ウイルスによる腫瘍増殖抑制効果に加えて, 腫瘍血管新生抑制効果も期待できる可能性が示唆された。

本研究は今後の癌遺伝子治療の発展に寄与するものであり, 十分に学位に値するものである。